

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年1 月18 日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/04286 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09 (JP). 菅野純夫 (SUGANO, Sumio) [JP/JP]; 〒167-0052 東京都杉並区南荻窪4-8-13 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04517
- (22) 国際出願日: 2000 年7 月6 日 (06.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/195104 1999 年7 月8 日 (08.07.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田紀夫 (OTA,
Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町
1-2-7-105 Kanagawa (JP). 若松 愛 (WAKAMATSU, Ai)
[JP/JP]; 〒292-0014 千葉県木更津市高柳1473-4-202
Chiba (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao) [JP/JP]; 〒300-
0303 茨城県稲敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP). 齋藤
薫 (SAITO, Kaoru) [JP/JP]; 〒292-0056 千葉県木更津
市木更津2-8-1-201 Chiba (JP). 鈴木 稯 (SUZUKI, Yu-
taka) [JP/JP]; 〒108-0072 東京都港区白金2-7-23 Tokyo
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING FULL-LENGTH cDNA LIBRARY

(54) 発明の名称: 完全長cDNAライブラリーの作製方法

(57) Abstract: A method whereby a cDNA library having an extremely high full-length ratio can be constructed starting with a material in a very small amount compared with the conventional methods. This method comprises optimizing reaction conditions in the steps of the alkaline phosphatase reaction, acid pyrophosphatase reaction and RNA ligase reaction in the conventional oligocap method.

(57) 要約:

従来のオリゴキャップ法における、アルカリ性ホスファターゼ反応、酸性ピロ
フォスファターゼ反応、および RNA リガーゼ反応の各段階の反応条件の至適化を
図り、従来の方法に比べてはるかに少ない量の出発材料からでも非常に高い完全
長率の cDNA ライブラリーを作製しうる方法の開発に成功した。

WO 01/04286 A1

明細書

完全長 cDNA ライブラリーの作製方法

技術分野

本発明は、cDNA ライブラリーの作製方法に関する。

背景技術

完全長 cDNA クローンは、遺伝子の転写産物や翻訳産物の一次構造を明らかにしたり、遺伝子の機能を実証的に解析するための重要なツールである。即ち、完全長 cDNA には、その翻訳産物たるタンパク質の一次配列の全ての情報が含まれるため、その構造の解析により、コードするタンパク質の構造を容易に予測することが可能である。また、完全長 cDNA を持ちいれば、適当な発現系を適用して、それがコードするタンパク質を大量に生産したり、適当な細胞系へ導入することによりその機能を生物活性として解析したりすることも可能となる。

完全長 cDNA を効率よく取得するためには、完全長 cDNA ライブラリーが有用である。ところが一般的な方法で作製した cDNA ライブラリーからは、完全長 cDNA を効率よく取得することは非常に困難である。cDNA ライブラリーの作製法として、比較的長い cDNA クローンが得やすいことから現在最も一般的となっている Gubler と Hoffman の方法(Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25: 263-269)では、第一鎖にアニールしている mRNA に切れ目を入れ、それをプライマーとして第二鎖 cDNA 合成を行っているため、原理的に mRNA の 5' 末端部分の cDNA を合成することができない。また、Okayama-Berg の方法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Biotechnology 24:210-219)では、ベクター配列から第二鎖 cDNA 合成のプライミングをするので、理論的には mRNA の 5' 末端部分の cDNA を取得するこ

とが可能である。しかし、この方法では長い cDNA の取得は難しく、クローン化効率も悪いと言われている。また、より重大な問題として、生体試料から抽出した mRNA には、分解が進んだ不完全長の mRNA がかなりの比率で含まれている。これらの方法では、このような分解した mRNA 分子由来の不完全長 cDNA も一緒に合成されてしまうため、高い完全長率の cDNA ライブラリーを作製することはできない。こうして合成された大量の不完全長 cDNA と完全長の mRNA から合成された cDNA を識別することは、実質的に不可能である。

これまでに、完全長 cDNA を効率よく取得するためのいくつかの方法が報告されている。完全長 cDNA を効率よく取得するためには、真核細胞の mRNA の 5' 末端に特異的な構造である CAP 構造を認識して分子を選別することが有効である。菅野らは、この CAP 構造を特異的に認識してそれを合成オリゴヌクレオチドと置換する「オリゴキャップ法」を開発した(K. Maruyama and S. Sugano, (1994) *Gene* 138: 171-174; Y. Suzuki et al., (1997) *Gene* 200: 149-156; 鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」(羊土社) pp.46-51)。また、林崎らは、CAP 構造をビオチン分子で特異的に標識する方法を開発した(P. Carninci et al., (1996) *Genomics* 37: 327-336; P. Carninci et al., (1996) *DNA Research* 4: 61-66)。その他、「オリゴキャップ法と岡山-バーグ法を組み合わせた方法」(S. Kato et al., (1994) *Gene* 150: 243-250)、「リンカー化学結合法 (Genet 法)」(Merenkova, N. et al. Method for the specific coupling of the CAP of the extremity 5' of a fragment mRNA and preparation of complete cDNA. PCT/FR96/00651, 1996)などが開発されている。いずれの方法でも、原理的に完全長 mRNA 分子由来の cDNA クローン選択的に集めてくることができる。現在、これらの方法に基づいて、完全長 cDNA を多く含む cDNA ライブラリーを構築することが可能となっている。

ところがいずれの方法においても、一般的な cDNA ライブラリー作製法に比べてより多くの出発材料を必要とする。報告されているプロトコールでは、最低で

もオリゴキャップ法ではポリ A RNA として約 5~10 μ g(Y. Suzuki et al., (1997) Gene 200: 149-156; 鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」(羊土社) pp.46-51)、キャップトラップ法ではポリ A RNA として約 5 μ g(P. Carninci et al., (1996) Genomics 37: 327-336; P. Carninci et al., (1996) DNA Research 4: 61-66)の RNA 試料を必要とする。また、出発材料として供与できる RNA 試料量が少ない場合、結果として得られる cDNA の完全長率が顕著に低下したり、得られるクローンタイターが低下するといった技術的な問題点を有していた。従って、少量の生体材料しか得られないといった制約がある場合、従来の方法で完全長率の高い cDNA ライブラリーを作製することは、非常に困難な状況にあった。

発明の開示

本発明は、少ない RNA 試料を出発材料とした場合でも完全長率の高い cDNA ライブラリーを作製しうる方法を提供することを課題とする。

従来のオリゴキャップ法では、以下の原理に基づき、完全長 mRNA の 5' 末端から 3' 末端までの全長部分を多く含む cDNA ライブラリーを作製していた(図 1 参照)。即ち、まず、

①mRNA 試料をバクテリアアルカリ性ホスファターゼ (BAP) で処理して不完全長の mRNA 分子の 5' 末端のリン酸基を取り除く。これにより 5' CAP 構造を有する完全長 mRNA 以外の mRNA の 5' 端をすべて水酸基に変換する。

②タバコ酸性ピロホスファターゼ (TAP) 処理を行って完全長 mRNA の 5' 末端の CAP 構造をリン酸基に変換する。これにより完全長 mRNA のみが 5' 端にリン酸基を有することになる。

③RNA リガーゼを用いて、完全長 mRNA の 5' 末端に合成オリゴ RNA (オリゴキャップリンカー) を結合させる。これにより 5' 端にリン酸基を有する完全長 mRNA のみが、その 5' 端に合成オリゴ RNA が付加されることになる。

④オリゴキャップリンカーを付加した mRNA を鋳型として第一鎖 cDNA を合成した後、オリゴキャップリンカー中の配列とオリゴ dT アダプターをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行う。これにより完全長 mRNA に対応する cDNA のみが増幅されることになる。

本発明者らは、このようにして作製したオリゴキャップライブラリーから得られた cDNA クローンの大量解析を行った。ところが、この方法で作製した cDNA ライブラリーの全長率は約 60～75%であることが判明した(T. Ota et al., (1998) *Microbial and comparative genomics*. 3:C-87)。cDNA ライブラリーごとのクローンタイターと全長率は用いた出発材料の量や質に大きく依存しており、少量の出発材料から作製した cDNA ライブラリーの場合には、クローンタイターが低下するだけでなく、完全長率も著しく低下する傾向が認められた。

本発明者らは、オリゴキャップ法におけるライブラリーの全長率の低下の原因として、2つの原因を考えた。即ち、一つは不完全長 mRNA の 5' 末端の脱リン酸化を行うバクテリアアルカリ性ホスファターゼ反応の不十分さであり、もう一つはバクテリアアルカリ性ホスファターゼ反応後におこる 5' 末端にリン酸基を生じる mRNA の分解である（上記工程①）。いずれの原因によっても、RNA リガーゼを用いたオリゴキャップリンカーの付加反応において、元々の RNA の CAP 構造の有無とは関係なく分解した不完全長の mRNA 分子の 5' 末端にオリゴキャップリンカーが付加されてしまい、その結果としてライブラリーとしての完全長率が低下してしまう。

一方、クローンタイターの低下は、タバコ酸性ピロホスファターゼによる脱キャップ反応の不十分さや RNA リガーゼによるオリゴキャップリンカーの付加反応の不完全さが原因になって引き起こされるものと考えた（上記工程②）。

ライブラリーの完全長率が使用する出発材料の量に大きく依存することから、本発明者らは、試料の状態や量に応じたオリゴキャッピング反応の各段階の反応条件の至適化、特に mRNA の分解を最小限に抑制する条件の設定が必要であると

考えた。作製した cDNA ライブラリーの全長率を正確に評価するためには、作製したライブラリーから得られるある程度まとまった数のクローンの配列の解析を行う必要があるが、ライブラリー作製時の多段階の反応条件を検討しながら、得られた cDNA ライブラリーの完全長率を評価し、その結果をフィードバックしていくことは非常に効率が悪い。

そこで、本発明者らは、効率よくオリゴキャップ法の各段階の反応条件の至適化やプロトコルの改善を図るため、ジゴキシゲニン(DIG)標識した合成オリゴ RNA を用いてオリゴキャッピング反応生成物を高感度に可視化する系を開発した。これによりオリゴキャップ法の際の各段階の反応状態や RNA の状態を迅速かつ高感度に評価できるようにした。

そして、この評価系を用いてオリゴキャップ反応の基質である mRNA の状態や各段階の反応の進行度を的確に評価することにより、mRNA の分解を最小限に抑制したプロトコルへの見直し、ならびにアルカリ性ホスファターゼ反応、酸性ピロフォスファターゼ反応、および RNA リガーゼの各段階の反応条件の至適化を図った。その結果、本発明者らは、上記各段階の反応工程における RNA 試料を、従来から用いられてきた poly A RNA から全 RNA へ変更することにより mRNA の分解を最小限に抑制すると共に、酸性ピロフォスファターゼ反応における反応液の pH を上昇させることにより mRNA の脱キャップ反応の効率を高めることができることを見出した。これにより、従来の方法に比べてはるかに少ない量の出発材料からでも非常に高い完全長率の cDNA ライブラリーを作製することが可能となる新しいプロトコルの開発に成功した。

即ち、本発明は、少ない RNA 試料を出発材料とした場合でも完全長率の高い cDNA ライブラリーを作製するオリゴキャップ法に関し、より具体的には、

(1) cDNA ライブラリーを作製する方法であって、

(a) mRNA およびそれ以外の RNA を含む RNA 試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端にリン酸基を有する不完全長 mRNA 分子の該リン酸基を除去する工程、

(b) 工程 (a) の処理後の RNA 試料を酸性ピロホスファターゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端に CAP 構造を有する完全長 mRNA の該 CAP 構造をリン酸基に変換する工程、

(c) 工程 (b) の処理後の RNA 試料を RNA リガーゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端の CAP 構造をリン酸基に変換された mRNA の 5' 末端に合成オリゴ RNA (オリゴキャップリンカー) を結合させる工程、

(d) 工程 (c) の処理後の RNA 試料からポリ A RNA を選択する工程、および

(e) 工程 (c) において使用した合成オリゴ RNA もしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴ dT アダプターをプライマーとして、工程

(d) において選択したポリ A RNA を鋳型に逆転写反応を行う工程、を含む方法、

(2) 工程 (a) において用いるアルカリ性ホスファターゼが細菌由来のアルカリ性ホスファターゼ (BAP) である、(1) に記載の方法、

(3) 工程 (b) において用いる酸性ピロホスファターゼがタバコ由来の酸性ピロホスファターゼ (TAP) である、(1) または (2) に記載の方法、

(4) 工程 (a) における RNA 試料が全 RNA (total RNA) である、(1) から (3) のいずれかに記載の方法、

(5) 工程 (b) における酸性ピロホスファターゼ処理を pH6.0 より高く pH8.0 以下の条件で行う、(1) から (4) のいずれかに記載の方法、

(6) (1) から (5) のいずれかに記載の方法により作製される cDNA ライブラリー、

(7) ゲノム上の遺伝子のプロモーターを含む転写制御領域を単離する方法であって、

- (a) (6) に記載の cDNA ライブラリーに含まれる cDNA の塩基配列を決定する工程、
- (b) 決定した塩基配列と対応するゲノム DNA の塩基配列とを比較し、ゲノム上の転写開始点を特定する工程、
- (c) 特定した転写開始点の上流のゲノム DNA 断片を単離する工程、を含む方法、を提供するものである。

本発明の cDNA ライブラリーの作製方法においては、まず、mRNA およびそれ以外の RNA を含む RNA 試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端にリン酸基を有する不完全長 mRNA 分子の該リン酸基を除去する（工程（a））。

従来のオリゴキャップ cDNA ライブラリーの完全長率を低下させる原因としては、アルカリ性ホスファターゼ反応の不十分さやアルカリ性ホスファターゼ処理後の mRNA の分解が考えられた。本発明の方法は、RNA 試料として mRNA 以外の RNA を含む RNA 試料を用いてオリゴキャッピング反応を行うことを特徴とし、これにより従来の方法で完全長率の低下の大きな原因となっていた反応中における mRNA の分解を顕著に抑制することができる。この mRNA の分解の抑制は、RNA 試料に含まれる mRNA 以外の RNA が、酵素標品に含まれる RNA 分解活性に対する mRNA の競合的な基質となることによる、cDNA の鋳型とする mRNA の分解の相対的な抑制であると考えられる。

本発明の方法に用いる「mRNA 以外の RNA」としては、例えば、リボゾーム RNA、polyA を持たない RNA 分子、および合成 RNA が挙げられる（本発明においては、polyA を持たない RNA 分子も「mRNA 以外の RNA」に含まれる）。本発明において用いる RNA 試料は、細胞から直接調製された全 RNA であってもよく、また、調製した mRNA 試料に対し他の RNA を混合して調製したものであってもよい。

本発明の方法に用いられるアルカリ性ホスファターゼとしては、その由来に特に制限はなく、例えば、細菌由来のもの（BAP）、Calf intestine、shrimp 由来

のものなどが用いられる。反応条件は、脱リン酸反応が達成される条件であれば特に制限はない。例えば、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNA クローニング」（羊土社）pp.46-51」に記載の条件にて反応を行なうことができる。

本発明の方法においては、次いで、工程（a）の処理後の RNA 試料を酸性ピロホスファターゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端に CAP 構造を有する完全長 mRNA の該 CAP 構造をリン酸基に変換する（工程（b））。

本発明の方法に用いられる酸性ピロホスファターゼとしては、その由来に特に制限はなく、例えば、タバコ由来のもの（TAP）を好適に用いることができる。酸性ピロホスファターゼ反応においては、反応を pH6.0 より高く 8.0 以下の条件で行うと好ましい。これにより従来のように pH5.5 で行う場合と比較して、mRNA の脱キャップ反応の効率を飛躍的に向上させることができる。

本発明の方法においては、次いで、工程（b）の処理後の RNA 試料を RNA リガーゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端の CAP 構造をリン酸基に変換された mRNA の 5' 末端に合成オリゴ RNA（オリゴキャップリンカー）を結合させる（工程（c））。

用いられる RNA リガーゼとしては、例えば、T4 ファージ酵素を好適に用いることができる。RNase の混入を防止するために、例えば、T4 ファージ酵素の遺伝子を RNase が欠損した大腸菌（A19）にクローン化した組換え体から調製した酵素を用いてもよい。リガーゼ反応の反応条件は、RNA の 3' 水酸基と RNA の 5' リン酸基を連結することができる反応条件であれば特に制限はなく、例えば、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNA クローニング」（羊土社）pp.46-51」に記載の条件にて反応を行なうことができる。リガーゼ反応に用いる合成オリゴ RNA としては、特に制限はない。

本発明の方法においては、次いで、工程（c）の処理後の RNA 試料からポリ A RNA を選択する（工程（d））。ポリ A RNA の選択方法としては一般的に行わ

れている方法、例えば、オリゴ dT セルロースカラムあるいはオリゴ dT ラテックスを用いて選択する方法などにより、好適に行うことができる。

本発明の方法においては、次いで、工程（c）において使用した合成オリゴ RNA もしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴ dT アダプターをプライマーとして、工程（d）において選択したポリ A RNA を鋳型に逆転写反応を行う（工程（e））。

逆転写反応の反応条件は、選択する酵素などにより変動しうるが、例えば、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNA クローニング」（羊土社）pp.46-51」に記載の条件で反応を行なうことができる。

本発明の方法によれば、5'-端の全長率が非常に高い cDNA ライブラリーを効率的に作製することができる。これにより転写開始点を容易に特定でき、転写開始点が特定できれば、それぞれの mRNA に対応する染色体 DNA の転写上流領域（プロモーターを含む転写制御領域）をクローニングすることができる。完全長 cDNA クローン、及び完全長 cDNA クローンの 5' 末端の配列情報からは、実験的にもコンピューター上の解析でも、容易にゲノムのプロモーター領域を含む転写制御領域の断片を取得、あるいはその情報を得ることが可能である。

従って、本発明は、また、上記本発明の cDNA ライブラリーの作製方法によって作製された cDNA を利用し、ゲノム上の遺伝子の発現制御領域を単離する方法を提供する。この方法は、（a）上記本発明の cDNA ライブラリーの作製方法によって作製された cDNA ライブラリーに含まれる cDNA の塩基配列を決定する工程、（b）決定した塩基配列と対応するゲノム DNA の塩基配列とを比較し、ゲノム上の転写開始点を特定する工程、および（c）特定した転写開始点の上流のゲノム DNA 断片を単離する工程、を含む方法によって実施することができる。

「転写調節領域の単離」および「転写制御因子の同定と精製」については、「細胞工学 別冊 8 新細胞工学実験プロトコール」（東京大学医科学研究所制癌研究部編 秀潤社 1993 年）の p352-398 に記載がある。該文献に記載の方法は転

写開始点の特定に S1 マッピング法等を用いているが、本発明の方法をもちいれば、5'-端の全長率が非常に高い cDNA ライブラリーが作製できるため、転写開始点の特定がかなり容易になる。

部位特異的に発現している遺伝子の情報を精度良く取得するためには、できるだけ限定された領域で発現している遺伝子の解析を行なうことが必要である。ところが、従来の方法では大量の試料からしか完全長 cDNA ライブラリーを作製することができなかったため、周辺部位で発現している遺伝子に由来する情報が混在してしまい、正確な部位特異な発現情報を解析することは困難であった。本法により、少量の生体試料からも完全長率の高い cDNA ライブラリーを作製することができるようになった。つまり、この方法によってより限定された組織切片から作製した完全長 cDNA ライブラリーを基に、部位特異的に発現している遺伝子の転写開始点の情報を精度よく得ることが容易になった。

最近の染色体 DNA と cDNA の関係、実験法、コンピューター解析法については、「Genome Analysis: A Laboratory Manual volume 1-4」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, volume 1: 1997 年, volume 2: 1998 年, volume 3-4: 1999 年) や「Methods in Enzymology 303 巻, Section II. Gene Identification」(Academic Press, 1999 年, p77-161) に記載がある。これら文献に記載の方法をもちいれば、cDNA の 5'-端配列より転写開始点上流領域がクローニングできる。

さらに、ヒトゲノムプロジェクトでは、ヒトゲノムのクローン化された BAC (Bacterial artificial chromosome) クローンを染色体にマップし、それぞれの BAC クローンの配列解析を行うことにより全ゲノム配列解析を完了する計画で進行している。したがって、mRNA の 5'-端配列が特定できれば、約 150 kb のヒトゲノムがクローン化された BAC クローンでの転写開始領域の特定もヒト染色体について可能となる。

本発明の方法は、例えば、以下のように実施することができる。各種臓器や細胞より、本発明の方法で cDNA ライブラリーを作製する。各 cDNA クローンについ

て、5'-端の配列をワンパス配列解析法により DNA シークエンサーで解析する（通常は数百塩基解析できる）。次いで、転写制御領域の単離を行なう。これには、in silico により転写制御領域を検索する方法と実験的に転写制御領域をクローニングする方法とがある。まず前者の方法は、それぞれの cDNA クローンの 5'-端配列について公共データベース中のゲノム配列等と BLAST 解析[S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]によりヒットする配列を検索する。ヒットする配列が存在する場合は、その上流配列数 kb 程度（通常は 1-2 kb で十分である）までを取得できれば、転写制御領域の配列が取得されたことになる。後者の方法としては、それぞれの cDNA の 5'-端配列をプローブとして、ゲノム DNA のクローン化された BAC クローンからクローニングしてくる方法等がある。

もっと容易には次に示す方法がある。J. M. Valdes ら[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5377-5381 (1994)]は、ヒトゲノムをクローン化した YAC (yeast artificial chromosome) やコスミドクローンから、転写開始点前後に存在することがある CpG island を基点にして、その前後のゲノム DNA をクローニングする方法を開発している。CpG island の配列のかわりに cDNA の 5'-端配列をもちいれば、より特異的に転写制御領域が取得できる。この時の鋳型としては、YAC やコスミドでなければならないわけではない。BAC クローンをを用いることも可能である。

転写制御領域をクローニングする目的の場合には、本発明の方法における cDNA ライブラリー作製時に、mRNA の 3'-側のプライマーとしてオリゴ dT プライマーのかわりに Y. Suzuki ら[Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)]に記載のランダムアダプタープライマー (random-adaptor primer) を用いることもできる。

図面の簡単な説明

図1は、オリゴキャップ法の原理を示す図である。

図2は、ポリ A RNA と全 RNA を基質としたときの RNA ライゲーション反応の比較を示す写真である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 10 μ g の細胞質全 RNA から精製したポリ A RNA を 25 μ l の反応系で 24 pmol の DIG 標識したオリゴ RNA と連結して泳動したもの

レーン 2 : 10 μ g の細胞質全 RNA を 200 μ l の反応系で 24 pmol の DIG 標識したオリゴ RNA と連結して泳動したもの

レーン 3 : 10 μ g の細胞質全 RNA を 300 μ l の反応系で 24 pmol の DIG 標識したオリゴ RNA と連結して泳動したもの

図3は、細胞質全 RNA を BAP 酵素量を変えて脱リン酸化反応させた後、DIG 標識したオリゴ RNA と連結した結果を比較した写真である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 150 μ l の反応系で 3.75U の BAP を用いて 37°C 1 時間反応させた後、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

レーン 2 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 200 μ l の反応系で 5.0U の BAP を用いて 37°C 1 時間反応させた後、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 250 μ l の反応系で 6.25U の BAP を用いて 37°C 1 時間反応させた後、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

レーン 4 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理せずに、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

図4は、細胞質全 RNA を BAP 酵素量を変えて脱リン酸化反応させた後の RNA の状態を比較した写真である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 20 μ g の細胞質全 RNA を泳動したもの

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 150 μ l の反応系で 3.75U の BAP を用いて 37°C 1 時間反応させた後、その 2/5 量をアガロースゲル電気泳動したもの

レーン 4 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 200 μ l の反応系で 5.0U の BAP を用いて 37°C 1 時間反応させた後、その 2/5 量をアガロースゲル電気泳動したもの

レーン 5 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 250 μ l の反応系で 6.25U の BAP を用いて 37°C 1 時間反応させた後、その 2/5 量をアガロースゲル電気泳動したもの

レーン 6 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP バッファー中で 37°C 1 時間保温した後、その 2/5 量をアガロースゲル電気泳動したもの

図 5 は、1.5mM の pNT を基質とした場合のフラクション A の TAP 酵素活性の pH 依存性を示した図である。酵素活性のもっとも高かった pH の活性を 100% として、相対活性で示した。

図 6 は、1.5mM の pNT を基質とした場合のフラクション B の TAP 酵素活性の pH 依存性を示した図である。酵素活性のもっとも高かった pH の活性を 100% として、相対活性で示した。

図 7 は、1.5mM の pNT を基質とした場合のフラクション C の TAP 酵素活性の pH 依存性を示した図である。酵素活性のもっとも高かった pH の活性を 100% として、相対活性で示した。

図 8 は、TAP 活性フラクション B の RNA 分解活性の pH 依存性を示した写真である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 20 μ g の細胞質 RNA

レーン 3 : 20 μ g の細胞質 RNA にフラクション B 酵素 2.0U と pH5.5 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 4 : 20 μ g の細胞質 RNA に pH5.5 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 5 : 20 μ g の細胞質 RNA にフラクシオン B 酵素 2.0U と pH5.7 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 6 : 20 μ g の細胞質 RNA に pH5.7 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 7 : 20 μ g の細胞質 RNA にフラクシオン B 酵素 2.0U と pH6.1 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 8 : 20 μ g の細胞質 RNA に pH6.1 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 9 : 20 μ g の細胞質 RNA にフラクシオン B 酵素 2.0U と pH6.5 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 10 : 20 μ g の細胞質 RNA に pH6.5 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 11 : 20 μ g の細胞質 RNA にフラクシオン B 酵素 2.0U と pH6.8 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 12 : 20 μ g の細胞質 RNA に pH6.8 に調整した TAP バッファーを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 13 : 20 μ g の細胞質 RNA にフラクシオン B 酵素 2.0U のみを加えて 37°C 16 時間保温したもの

レーン 14 : 20 μ g の細胞質 RNA のみで 37°C 16 時間保温したもの

図 9 は、細胞質全 RNA を BAP 処理後、反応 pH を変えて TAP による脱キャップ反応を行った後、DIG 標識したオリゴ RNA と連結した結果を比較した写真である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシオン B 酵素を用いて pH5.5 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシヨン B 酵素を用いて pH5.7 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

レーン 4 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシヨン B 酵素を用いて pH6.0 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

レーン 5 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシヨン B 酵素を用いて pH6.5 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

レーン 6 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシヨン B 酵素を用いて pH6.8 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

図 10 は、少量の RNA 試料でオリゴキャップ反応を行った結果を示した写真である。5~100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシヨン B 酵素を用いて pH 6.5 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行いた後、オリゴ RNA と連結し、これを鋳型にオリゴ dT アダプターをプライマーとして第 1 鎖 cDNA を合成した。これを鋳型としてプライマー FL3-666 (配列番号 : 3) とプライマー EF1-1R (配列番号 : 4) の組み合わせ、及びプライマー EF1-3F (配列番号 : 5) とプライマー FL3-705 (配列番号 : 6) の組み合わせで、それぞれ EF1 α の 5' 末端領域及び 3' 末端領域を PCR により増幅を行い、アガロースゲル電気泳動を行った。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。増幅した EF1 α の 5' 末端 650 塩基の断片と 3' 末端 644 塩基の断片の位置を矢印で示した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 100 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 5' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 3' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 4 : 20 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 5' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 5 : 20 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 3' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 6 : 5 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 5' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 7 : 5 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 3' 末端領域の増幅を行ったもの。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 ジゴキシゲニン (DIG) 標識合成オリゴ RNA を用いたオリゴキヤッピング反応の評価法

cDNA ライブラリーの全長率を正確に評価するためには、ライブラリーから得られたある程度まとまった数のクローンの配列を解析する必要がある。したがって、その結果をフィードバックしながら多段階に及ぶ各ステップの反応条件を至適化していくことは、きわめて効率が悪い。そこで本発明では、まず DIG 標識した合成オリゴ RNA を用いてオリゴキヤッピング反応を行うことにより、オリゴキヤッピング反応生成物を高感度に可視化する系を開発した。

合成オリゴ RNA KM02 (配列 5' - AGC AUC GAG UCG GCC UUG UUG GCC UAC UGG -3' / 配列番号 : 1) の 5' 末端を DIG (ベーリンガー・マンハイム社) で標識した。この DIG 標識合成オリゴ RNA を用いてオリゴキヤッピング反応を行った。ポリ A RNA 換算で 0.2 μ g に相当する量の RNA (全 RNA として約 10 μ g) に対し、24 pmol

の DIG 標識合成オリゴ RNA を用いた。RNA リガーゼ反応後、反応生成物をオリゴ dT セルロースカラム、タイプ II (コラボレイティブリサーチ社) にかけてポリ A RNA を精製した。その全量を MOPS バッファー (20mM 3-モフフォリノプロパン スルホン酸 (MOPS) pH7.0, 5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA) を用いて 18%(v/v) ホルムアルデヒド変性 1.0%(w/w) アガロースゲル電気泳動を行った。これを 20 x SSC バッファー (3.6M 塩化ナトリウム、0.3M クエン酸ナトリウム pH7.0) を用いてキャピラリートランスファー法によりプラスチャージナイロン膜(ペーリンガーマンハイム社)にプロットした後、ストラタジーン UV クロスリンカーを用いて UV クロスリンクを行った。こうして作製したフィルター上で、DIG 発光検出キット (ペーリンガーマンハイム社) を用い、オリゴキャッピング反応生成物、すなわち DIG 標識合成オリゴ RNA が結合した RNA 分子及び未反応の合成オリゴ RNA 分子の検出を行った。図 2 に一例を示したように、DIG 標識合成オリゴ RNA を用いて合成オリゴ RNA 連結反応を行うことにより、高分子量化したオリゴキャッピング反応生成物を高感度に検出することができた。

このことにより、オリゴキャッピング反応の際の各段階の反応の進行状態や RNA の状態を比較的容易に評価できるようになった。

[実施例 2] RNA リガーゼ反応の至適化

ポリ A RNA と細胞質全 RNA を基質として、RNA リガーゼによる DIG 標識合成オリゴ RNA の RNA 分子の 5' リン酸末端への連結反応を行った。RNA リガーゼの反応条件は、文献「鈴木稔、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」 (羊土社) pp. 46-51」に従った。ポリ A RNA を出発材料とした場合には、10 μ g の細胞質全 RNA からオリゴ dT セルロースカラムタイプ II (コラボレイティブリサーチ社) で精製したポリ A RNA として 24 pmol の DIG 標識したオリゴキャップリンカーを連結した。細胞質全 RNA を出発材料とした場合には、10 μ g の細胞質全 RNA を基質とし、24 pmol の DIG 標識したオリゴキャップリンカーを連結した後、オリゴ dT セルロースカラムタイプ II を用いてポリ A セレクションを行いポリ A RNA を精

製した。図2に示したように、DIG 標識合成オリゴ RNA を用いてオリゴキャップリンカー連結反応を行った結果、高分子量化したオリゴキャッピング反応生成物を検出することができた。この結果から、全 RNA の状態で反応を行った場合でも、効率よく RNA の 5'-リン酸末端に合成オリゴ RNA を連結することが可能であることが明らかとなった。またポリ A RNA を基質にした場合には、全 RNA を基質にした場合に比べて標識された反応生成物の分子量が明らかに小さくなっていた。このことから、RNA リガーゼの反応中にも RNA の分解は起きていること、さらに全 RNA の状態で RNA リガーゼ反応を行うことにより、ポリ A RNA を基質とした場合に比べて、RNA リガーゼ反応中の mRNA 分子の分解が抑えられることが明らかとなった。

[実施例3] BAP 反応条件の至適化

細胞質全 RNA を基質として BAP 処理を行った後、RNA リガーゼを用いて DIG 標識合成オリゴ RNA を付加した。BAP 処理の反応条件は、文献「鈴木稔、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」 (羊土社) pp.46-51」に従った。) DIG 標識合成オリゴ RNA 連結後、polyA セレクションを行い、ポリ A RNA を精製した。

図3に示したように、細胞質全 RNA を基質とした場合でも、RNA の 5' リン酸末端の脱リン酸化が行われ、高分子量画分に検出される DIG 標識されたオリゴキャッピング反応生成物が減少した。また、全 RNA を基質にした場合には、BAP 反応中における RNA の分解によると思われる低分子量化は認められなかった (図4)。

[実施例4] タバコ培養細胞からの TAP の精製

オリゴキャップ法の反応過程においては、TAP を用いた脱キャップ反応の間に最も顕著な RNA 分解が起きており、これがライブラリーの全長率を低下させる最大の要因となっているものと考えられた。そこで、種々の市販の入手可能な TAP 標品の比較検討を行ったが、十分に RNA 分解活性が低い TAP 標品を得ることができなかった。そこでタバコ BY2 細胞を培養し、RNA 分解活性の低い TAP 酵素の精製を行った。

TAP の精製は Shinshi らが記載した方法(H. Shinshi et al. (1976) *Biochemistry* 15: 2185-2190)を一部改変して行った。タバコ BY2 細胞を、MS 培地 (シグマ) を用い、暗条件、28°C で 10 日間、振盪培養した。得られた細胞を破碎後、硫酸アンモニウム沈殿させ、DEAE-セルロース SH カラム (和光純薬社)、ホスホセルロース P11 カラム (ワットマン社)、CM-セファロース CL-6B カラム (ファルマシア社) 及びセファデックス G200 カラム (ファルマシア社) を用いて TAP 酵素を精製した。TAP 活性は、セファデックス G200 カラムクロマトグラムで明らかに分離される 2 つの活性画分、高分子量画分と低分子量画分が認められた。低分子量画分はさらに DEAE-セルロース SH カラムで分離される 2 つの活性画分に分かれた。いずれのフラクションにおいても脱キャップ活性が認められ、その差はほとんど認められなかった。

TAP 活性は、1.5mM チミジン-5'-モノホスフェートパラニトロエステル(pNT、SIGMA 社)を基質として 30°C で反応させた後、終濃度 66mM となるように水酸化ナトリウム溶液を添加して反応を停止させ、生成したパラニトロフェノールの量を 400nm での吸光度を調べることにより測定した。酵素活性はチミジン-5'-モノホスフェートパラニトロエステルから 1 分間に 1 μ mol のパラニトロフェノールを生成する酵素量を 1U とした。パラニトロフェノールの分子吸光係数は 18000 として計算した。

〔実施例 5〕 TAP 反応の至適化

Shinshi らによれば、TAP の反応至適 pH は NAD⁺を基質とした場合には pH5.3、pNT を基質とした場合には pH6.0 と報告されている(H. Shinshi et al. (1976) *Biochemistry* 15: 2185-2190)。市販されている TAP 酵素のサプライヤーがプロトコールで示している条件では、多くの場合、pH5.5~6.0 の範囲の条件で行っており、先に菅野らが報告したオリゴキャップ法のプロトコールにおいても、TAP 反応は pH5.5 で行っていた (K.Maruyama and S.Sugano. (1994) *Gene* 138:171-174、Y.Suzuki et al. (1997) *Gene* 200:149-156、丸山和夫、菅野純夫「オリ

ゴキヤップ法と PCR を用いる全長 cDNA ライブラリーの作製」、丸山和夫、菅野純夫「オリゴキャップ置換による mRNA の 5' 末端クローニング」実験医学 vol.11, No.18, p2491-2495、鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」羊土社 pp. 46-51、S.Kato et al. (1994) Gene 150:243-250、Tabacco acid phosphatase 添付説明書(和光純薬)、Tabacco acid phosphatase 添付説明書(Epicentre 社))。今回精製した TAP 活性フラクションの反応 pH による影響を調べたところ、1.5mM の pNT を基質とした場合、フラクション A、フラクション B、フラクション C とも pH5.5~6.9 で強い TAP 活性を示した。pNT を基質とした場合の至適 pH はフラクション A で pH5.7 (図 5)、フラクション B で pH6.5 (図 6)、フラクション C で pH6.0 (図 7) だった。

次に、TAP 反応時における RNA 分解の pH による影響を調べた。20 μ g の細胞質 RNA に pH5.5~pH6.9 に調整した TAP バッファーとフラクション B の TAP 酵素を加えて 37°C 16 時間保温し、その間の RNA の分解の様子を調べた。その結果、pH 6.0 以下では RNA の分解が認められた (図 8)。また、フラクション A とフラクション B の TAP 酵素を用い、RNA を基質とした際の脱キャップ反応時における pH の影響を調べた。細胞質全 RNA を基質として BAP 処理を行った後、pH5.5~6.9 の範囲に調整した酢酸ナトリウムバッファーに溶解し、37°C で 1 時間反応を行った。TAP 反応後、RNA リガーゼを用いて DIG 標識した合成オリゴ RNA を連結させ、反応生成物を解析した。また、DIG 標識された反応精製物を調べたところ、pH6.5 で TAP 処理を行った場合に最も効率的に mRNA が脱キャップされることが明らかとなった (図 9)。デンストメーターを用いて調べたところ、pH6.5 での脱キャップ活性は従来の反応条件である pH5.5 に比べて 3 倍以上だった。以上の結果から、pH6.5 で脱キャップ反応を行うことにより、作製されるライブラリーの全長率、クローンタイターとも改善されることが期待された。

〔実施例 6〕 改良したプロトコールによるオリゴキャッピング反応の評価

NT2 細胞から抽出した 5~100 μ g の細胞質全 RNA を出発材料として、オリゴキヤッピング反応を行った。得られた反応生成物を鋳型とし、オリゴ dT アダプタープライマー FL3-706L (配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT GGC CTT TTT TT TTT TTT TTT -3' / 配列番号 : 2) をプライマーとして、第一鎖 cDNA を合成した。オリゴキヤッピングした mRNA 標品を最終容量が 25 μ l となるように第一鎖 cDNA 合成バッファー (ライフテクノロジー社、50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.3、75mM 塩化カリウム、3mM 塩化マグネシウム、0.8mM dNTP、12mM ジチオスレイトール、0.5 μ l RNase 阻害剤) に溶解し、5 pmol のオリゴ dT アダプタープライマー FL3-706L と 200U のスーパースクリプト II (ライフテクノロジー社) を加えて 16°C で 1 時間保温後、さらに 42°C で 1 時間反応させた。これに 25 μ l の H₂O を加え、フェノールクロロホルム処理した後、7.5 μ l の 0.1N NaOH と 1 μ l の 0.5M EDTA を加えて 65°C で 60 分保温し、RNA 鎖を分解した。これをフェノールクロロホルム処理、エタ沈後、50 μ l の TE バッファー (pH8.0) に溶解した。その他の反応条件は、文献「鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」 (羊土社) pp.46-51」に従った。

このようにして作製した第一鎖 cDNA を鋳型に用い、オリゴキャップリンカープライマー FL3-666 (配列 5'-AGC ATC GAG TCG GCC TTG TTG -3' / 配列番号 : 3) と EF1 α プライマー EF1-1R (配列 5'-TGC TAC TGT GTC GGG GTT GTA-3' / 配列番号 : 4)、あるいは EF1 α プライマー EF1-3F (配列 5'-CCT GAA CCA TCC AGG CCA AAT-3' / 配列番号 : 5) とオリゴ dT アダプタープライマー FL3-705 (配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT -3' / 配列番号 : 6) を用いて PCR を行った。この PCR では、それぞれ EF1 α 遺伝子の 5' 末端断片 650 塩基と 3' 末端断片 644 塩基の断片が増幅される。第一鎖 cDNA の 1/40 量 (1.25 μ l) を反応容量が 25 μ l となるように PCR バッファー (10mM トリス塩酸緩衝液 pH8.3、50mM 塩化カリウム、1.5mM 塩化マグネシウム、0.2mM dNTP) に溶解し、各々 2.5 pmol ずつのプライマーと 2.5U の Takara Taq (宝酒造) を加えて反応を行った。反応

はパーキンエルマーモデル 9600 を用い、95°C 5 分保温後、95°C 30 秒、52°C 1 分、72°C 1 分の条件で 17 ないし 22 サイクル反応を行った。PCR 終了後、その 1/5 量 (5 μ l) を TBE バッファー (45mM トリスほう酸緩衝液、2mM EDTA pH8.0) を用いて 2.0%(w/w)アガロースゲル電気泳動を行い、各断片の増幅を調べた。その他の反応条件は、文献「鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」 (羊土社) pp.46-51」に従った。))

100~20 μ g の RNA を用いた場合には、17 サイクルの PCR で、5' 末端側で増幅された断片と 3' 末端側で増幅された断片がほぼ 1 : 1 の比率で検出された (図 10)。この結果から、ほぼ 100%に近い状態で完全長 mRNA の 5' 末端にオリゴキャップされていることが示唆された。また、5 μ g の細胞質全 RNA を用いて行った場合でも、17 サイクルの PCR で 5' 末端にオリゴキャップリンカーが付加された EF1 α mRNA に対する第一鎖 cDNA から増幅された断片をはっきりと検出することができた。

[実施例 7] オリゴキャップ cDNA ライブラリーの作製

NT2 細胞、SK-N-MC 細胞、H4 細胞を培養し、Maniatis が記載した方法 (Sambrook, J. et al. "Molecular cloning, a laboratory manual/ second edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 Chapter 8.3.) にしたがって細胞質全 RNA を抽出した。

また、クローンテック社よりヒト副腎 (64016-1)、ヒト全脳 (64020-1)、ヒト肝臓 (64022-1)、ヒト脾臓 (64034-1)、ヒト胸腺 (64028-1)、ヒト気管 (64091-1) の全 RNA を購入した。NT2 細胞では 100 μ g、50 μ g、5 μ g の細胞質全 RNA、それ以外では 100 μ g の細胞質全 RNA を用いた。以下には、100 μ g の細胞質全 RNA を出発材料としてオリゴキャップ cDNA ライブラリーを作製した場合のプロトコールを示した。尚、出発材料が 50 μ g 及び 5 μ g の細胞質全 RNA の場合には、すべての反応容量を 1/2、1/20 にして行った。

100 μ g の細胞質全 RNA を反応容量が 200 μ l となるように BAP バッファー (0.1M トリス塩酸緩衝液 pH7.0、10mM 2-メルカプトエタノール、216U RNase 阻害剤 (プロメガ社)) に溶解し、5U の BAP (RNase フリー、宝酒造社) を加えて 37°C、60 分間反応させた。これをフェノールクロロホルム処理し、エタ沈後、反応容量が 100 μ l となるように TAP バッファー (50mM 酢酸ナトリウム pH6.5、1mM EDTA、10mM 2-メルカプトエタノール、108U RNase 阻害剤 (プロメガ社)) に溶解した。これに、タバコ細胞から精製した TAP 酵素 1U を添加し、37°C で 60 分間反応させた。これをフェノールクロロホルム処理し、エタ沈後、反応容量が 300 μ l となるように RNA リガーゼバッファー (50mM トリス塩酸緩衝液 pH7.0、10mM 2-メルカプトエタノール、5mM MgCl₂、0.5mM ATP、300U RNase 阻害剤 (プロメガ社)、25% ポリエチレングリコール 8000) に溶解し、120 pmol の合成オリゴ RNA KM-02 (配列 5'-AGC AUC GAG UCG GCC UUG UUG GCC UAC UGG -3' / 配列番号: 1) と 525U の RNA リガーゼ (RNase フリー、宝酒造) を加えて、20°C で 3 時間反応させた。さらにこれに 600 μ l の H₂O を加え、フェノールクロロホルム処理とエタ沈を行った。ついでこれを 2ml のカラムローディングバッファー (20mM トリス塩酸緩衝液 pH7.6、0.1M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、0.05% N-ザルコシン酸ナトリウム) に溶解し、カラムローディングバッファーで平衡化したオリゴ dT セルロースカラムタイプ II (コラボレイティブリサーチ社) を通し、4.5ml のカラムローディングバッファーで洗浄後、900 μ l の溶出バッファー (10mM トリス塩酸緩衝液 pH7.6、1mM EDTA、0.05% SDS) で溶出し、オリゴキャップされたポリ A RNA フラクションを回収した。

上述のようにしてオリゴキャッピングした mRNA の全量 (約 1 μ g) を反応容量が 25 μ l となるように第一鎖 cDNA 合成バッファー (50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.3、75mM 塩化カリウム、3mM 塩化マグネシウム、12mM ジチオスレイトール、各 0.8mM dNTP 混合用液) に溶解し、5 pmol のオリゴ dT アダプタープライマー FL3-7 05 (配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'

／配列番号：2）を加えて200Uのスーパースク립トII（ライフテクノロジー社）を加えて16℃で1時間反応後、さらに42℃で1時間反応させた。これに等量のH₂Oを加え、フェノールクロロホルム処理を行い、7.5μlの0.1N水酸化ナトリウム溶液と1μlの0.5M EDTAを加え、65℃で60分保温した。その後、10μlの1M トリス塩酸緩衝液 pH7.8を加え、さらに35μlの7.5M 酢酸アンモニウムと250μlのエタノールを加えてエタ沈を行い、得られた沈殿を50μlのTEバッファー（pH8.0）に溶解した。この第一鎖cDNAの1/5量（10μl）を鋳型として、オリゴキャップリンカープライマー FL3-666（配列 5'-AGC ATC GAG TCG GCC TTG TTG -3'／配列番号：3）とオリゴdTアダプタープライマー FL3-705（配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT -3'／配列番号：6）を用いて高忠実度長鎖PCRを行った。PCRはジーンアンプXL PCRキット（パーキンエルマー社）を用い、容量100μlの系でプライマーをそれぞれ8 pmol ずつを添加して行った。反応はパーキンエルマーモデル9600を用い、95℃ 5分保温後、95℃ 1分、58℃ 1分、72℃ 10分の温度条件で15サイクル行った。得られた反応生成物のフェノールクロロホルム処理とエタ沈を行った後、全量を100μlの牛血清アルブミンを加えたNEB バッファー2（ニューイングランドバイオラボ社、10mM トリス塩酸緩衝液 pH7.9、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1 mg/ml(w/v) 牛血清アルブミン）に溶解し、40UのSfiI（ニューイングランドバイオラボ社）を添加して、50℃で3.5時間反応させて5'末端のオリゴキャップリンカー及び3'末端のオリゴdTアダプター内にデザインしてあるSfiI配列の切断を行った。フェノールクロロホルム処理、エタ沈を行った後アガロースゲル電気泳動により1kb以上の断片をジーンクリーン（バイオ101）を用いて回収した。この1/2量に約50ngのDraIIIで切断したクローニングベクターpME18SFL3を加え、DNAライゲーションキットバージョン1（宝酒造）を用いて、反応容量30μlで、16℃で15時間反応させた。

〔実施例8〕 作製したcDNAライブラリーの完全長率の評価

作製した cDNA ライブラリーの一部を大腸菌 DH10B 株にバイオラド E. coli パルサーを用いてエレクトロポレーションし、形質転換体を得た。100 μ g の全 RNA をオリゴキャップし、15 サイクル PCR を行って作製したライブラリーでは、用いた RNA (50 ないし 100 μ g の細胞質全 RNA) に換算して約 80 万～330 万クローンの形質転換体を得られた (表 1)。これらの形質転換体をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地で 37°C で一晩振盪培養後、クラボウ自動プラスミド抽出機 PI シグマ 1000 を用いてプラスミド DNA を抽出した。これらのプラスミドクローンの cDNA の 5' 末端からのシングルパス配列を、ABI ビッグダイターミネーターキットを用い、ABI PRISM 377 DNA 自動シーケンサーで決定した。これらの配列を、ワシントン大学の Blast 2.0 を用いて GenBank データベースに対する相同性検索を行った。GenBank の既知の mRNA と同一遺伝子に由来すると判断されたクローンの 5' 末端配列を GenBank 中の配列と比較することにより、そのクローンの 5' 末端が完全長であるかどうかを評価した。すなわち、得られたクローンの 5' 末端が GenBank の配列より長い場合には「5' 末端全長クローン」とした。GenBank の配列の翻訳開始コドンを含む場合には「翻訳開始点全長クローン」、含まない場合には「不完全長クローン」とした。便宜的に、(翻訳開始点全長クローン) / (翻訳開始点全長クローン + 不完全長クローン) をその cDNA ライブラリーの完全長率 (全長クローンの比率) とした。

100 μ g ないし 50 μ g の細胞質全 RNA (ポリ A RNA 換算でそれぞれ約 2 μ g と約 1 μ g) を用いてライブラリーを作製した場合、翻訳開始コドンを含む「翻訳開始点全長クローン」をあわせた cDNA ライブラリーの完全長率は、89～99% 程度であった (表 1、表 2)。

表 1

改良プロトコルで作製したオリゴキヤップ cDNA ライブラリーの完全長率の評価 (培養細胞 RNA より)									
RNA が由来する細胞	NT2	NT2	NT2	NT2	NT2	NT2	SK-N-MC	H4	
全 RNA (μg)	100	100	100	50	5	100	100	100	
PCR サイクル数	15	10	5	15	15	15	15	15	
単離されたクローン数	3.3 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	8.5 X 10 ⁴	1.6 X 10 ⁴	2.5 X 10 ⁴	8.0 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁵		
シークエンスしたクローン数	192	192	192	192	192	192	192	192	
シークエンスが決定されたクローン数	174	182	121	178	189	187	184		
既知の mRNA ヒット数	67	59	52	74	70	66	70		
5'-末端全長クローン数	54	47	42	55	54	47	54		
翻訳開始点全長クローン数	66	55	50	66	65	59	68		
不完全長クローン数	1	4	2	8	5	7	2		
翻訳開始点全長クローンの比率	98.5%	93.2%	89.2%	96.2%	92.9%	89.4%	97.1%		

27
表 2

改良プロトコルで作製したオリゴキヤップ cDNA ライブラリーの完全長率の評価（市販ヒト組織 RNA より）						
RNA が由来する細胞	副腎	全脳	肝臓	脾臓	胸腺	気管
全 RNA (μ g)	100	100	100	100	100	100
PCR サイクル数	15	15	15	15	15	15
シークエンスしたクローン数	192	192	192	192	192	192
シークエンスが決定されたクローン数	184	183	189	182	185	187
既知の mRNA ヒット数	79	68	70	57	60	62
5'-末端全長クローン数	63	54	59	44	43	54
翻訳開始点全長クローン数	71	64	68	51	54	59
不完全長クローン数	8	4	2	6	6	3
翻訳開始点全長クローンの比率	89.9%	94.1%	97.1%	89.5%	90.0%	95.2%

この値は、従来の方法でより多くの生体試料から作製したオリゴキャップ cDNA ライブラリーを解析して得られた結果の 60~75%(T. Ota et al. (1998) Microbial and comparative genomics 3:C-87)に比べて、きわめて高かった。以上の結果から、本研究で改善したプロトコルでは、従来のプロトコルで作製した場合に比べて完全長率が高く、またより少ない RNA 試料からも完全長率の高い cDNA ライブラリーを作製できることが示された。

また、従来、分解が進んだ RNA 分子が含まれているため完全長 cDNA ライブラリー構築のための材料としては適さないとされていた、組織由来の市販の RNA 標品を出発材料として用いても、高品質の完全長ライブラリーができることが明らかになった。

〔実施例 9〕 第 2 鎖 cDNA 合成の PCR 回数を減らした場合のクローンタイター数

100 μ g の NT2 細胞由来の全 RNA をオリゴキャップし、10 及び 5 サイクル PCR を行って cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーの一部を大腸菌 DH10B 株にバイオラド E. coli パルサーを用いてエレクトロポレーションし、形質転換体を得た。その結果、100 μ g の細胞質全 RNA に換算してそれぞれ 100 万 クローン、8 万 5 千クロンの形質転換体を得られた。

産業上の利用の可能性

本発明により、従来のオリゴキャップ方法で完全長率の低下の大きな原因となっていた反応中における mRNA の分解を顕著に抑制することが可能となった。これにより、従来の方法で作製した cDNA ライブラリーと比べて、cDNA ライブラリーの完全長率を著しく上昇させることができた。本発明者らによる解析では、従来の方法で作製したオリゴキャップライブラリーの完全長率は約 60~75%であったが、本発明の方法で作製した cDNA ライブラリーでは、従来の方法に用いてい

た量の 1/5～1/100 量の出発材料しか使わなかった場合でも、約 89～99%と極めて高い完全長率の cDNA ライブラリーを作製できた。

また、本発明の方法においては、酸性ピロフオスファターゼ反応時の pH 条件を変更することにより、CAP 構造を有する mRNA の脱キャップ反応の効率を 3 倍以上に上昇させることができ、cDNA ライブラリーを作製した際の完全長 cDNA として得られるクローンタイターを飛躍的に上昇させることができた。これにより、より少ない材料からも多くのクローンタイターが得られるオリゴキャップライブラリーの作製が可能になった。本発明の方法によれば、poly A RNA 量で換算で、従来の方法で用いていた量のわずか 1/10 の RNA からライブラリーを作製した場合でも、100 万クローンを越える十分な数の形質転換体を得ることができる。

オリゴキャップ法では、cDNA ライブラリーの作製の段階でポリメラーゼ連鎖反応を行っていることが問題点の一つとして指摘されている。ポリメラーゼ連鎖反応では、試験管内での DNA 複製の間に人為的な変異が導入されることや、特異的な断片、特に長さの短い断片が優先して増幅されることによって生じるバイアスなどが危惧されている。本発明の方法においては、従来法からのタバコ酸性ピロフオスファターゼ反応の条件の変更により、オリゴキャッピング効率が上昇したことで、cDNA ライブラリー作製の段階におけるポリメラーゼ連鎖反応の回数を減らし、こうした問題点を低減させることも可能になった。実際、従来の方法の 1/10 量の RNA からライブラリーを作製した場合、PCR のサイクル数を 5 サイクルまで減らしても、約 8 万 5 千クローンを得ることができた。

本発明で示した完全長 cDNA ライブラリー作製法では、従来、きわめて困難とされていた少ない RNA 試料から完全長率の高い cDNA ライブラリーを作製することが可能となったが、このことは、ゲノム解析で明らかにされてくる大量の遺伝子の機能を明らかにするための学術研究分野、あるいは産業上有用な遺伝子の完全長 cDNA を効率良く取得していく目的、さらにはこうした学術研究や産業化研究活動を支援するための完全長 cDNA ライブラリー作製用キットの開発、あるい

は遺伝子リソースとしての高品質の cDNA ライブラリーの商業的供給において、本発明が極めて重要な基盤技術となることを示している。

また、本発明により、上記本発明の方法により作製された cDNA を利用して、ゲノム上のプロモーターを含む転写制御領域を単離する方法が提供された。2000 年春にはヒトゲノムの 90%以上をカバーするラフドラフト（精度が少し低いヒトゲノム配列解析）が完了し、さらに、2003 年までにはヒト全ゲノム配列解析が完了する計画になっている。長いイントロンの存在するヒトゲノムより転写開始点を解析ソフトで解析することはかなり困難がともなう。しかしながら、本発明の cDNA ライブラリー作製法を用いれば、全長 cDNA の 5'-端配列からゲノム配列上での mRNA 転写開始点が容易に特定できるため、転写開始点上流配列の中に含まれるプロモーターを含む転写制御に関わるゲノム領域を取得することが容易になる。

請求の範囲

1. cDNA ライブラリーを作製する方法であって、
 - (a) mRNA およびそれ以外の RNA を含む RNA 試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端にリン酸基を有する不完全長 mRNA 分子の該リン酸基を除去する工程、
 - (b) 工程 (a) の処理後の RNA 試料を酸性ピロホスファターゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端に CAP 構造を有する完全長 mRNA の該 CAP 構造をリン酸基に変換する工程、
 - (c) 工程 (b) の処理後の RNA 試料を RNA リガーゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端の CAP 構造をリン酸基に変換された mRNA の 5' 末端に合成オリゴ RNA (オリゴキャップリンカー) を結合させる工程、
 - (d) 工程 (c) の処理後の RNA 試料からポリ A RNA を選択する工程、および
 - (e) 工程 (c) において使用した合成オリゴ RNA もしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴ dT アダプターをプライマーとして、工程 (d) において選択したポリ A RNA を鋳型に逆転写反応を行う工程、を含む方法。
2. 工程 (a) において用いるアルカリ性ホスファターゼが細菌由来のアルカリ性ホスファターゼ (BAP) である、請求項 1 に記載の方法。
3. 工程 (b) において用いる酸性ピロホスファターゼがタバコ由来の酸性ピロホスファターゼ (TAP) である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. 工程 (a) における RNA 試料が全 RNA (total RNA) である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。
5. 工程 (b) における酸性ピロホスファターゼ処理を pH6.0 より高く pH8.0 以下の条件で行う、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
6. 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法により作製される cDNA ライブラリー。

7. ゲノム上の遺伝子のプロモーターを含む転写制御領域を単離する方法であって、

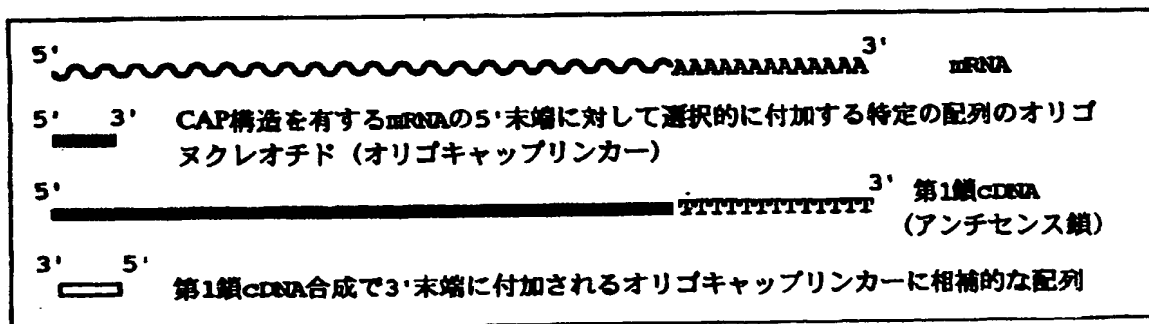
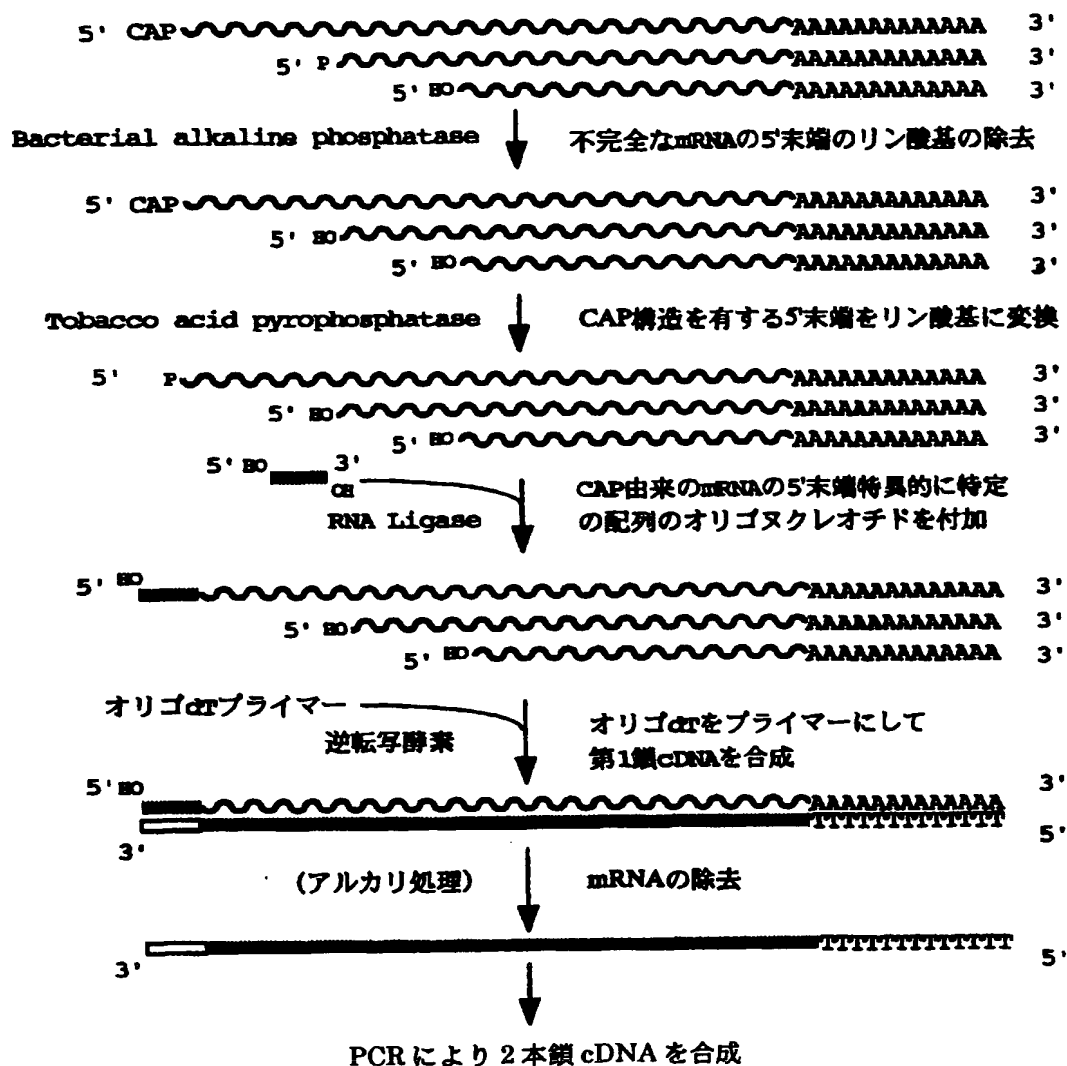
(a) 請求項 6 に記載の cDNA ライブラリーに含まれる cDNA の塩基配列を決定する工程、

(b) 決定した塩基配列と対応するゲノム DNA の塩基配列とを比較し、ゲノム上の転写開始点を特定する工程、

(c) 特定した転写開始点の上流のゲノム DNA 断片を単離する工程、を含む方法。

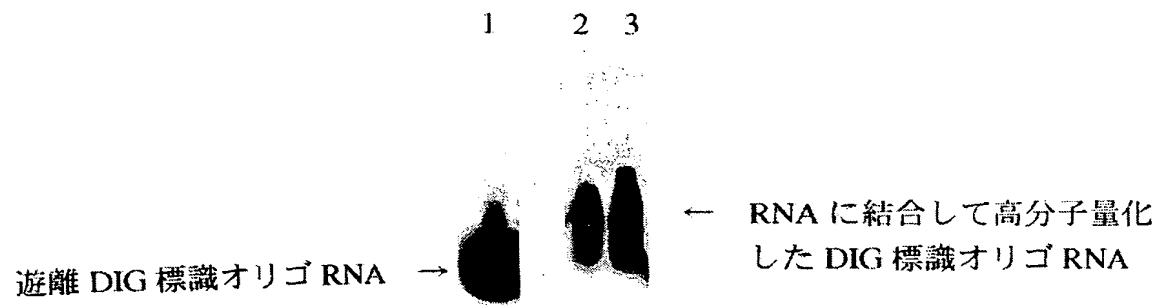
1 / 10

図 1



2 / 10

図 2



3 / 1 0

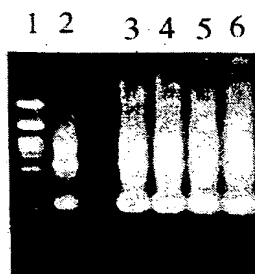
☒ 3

1 2 3 4



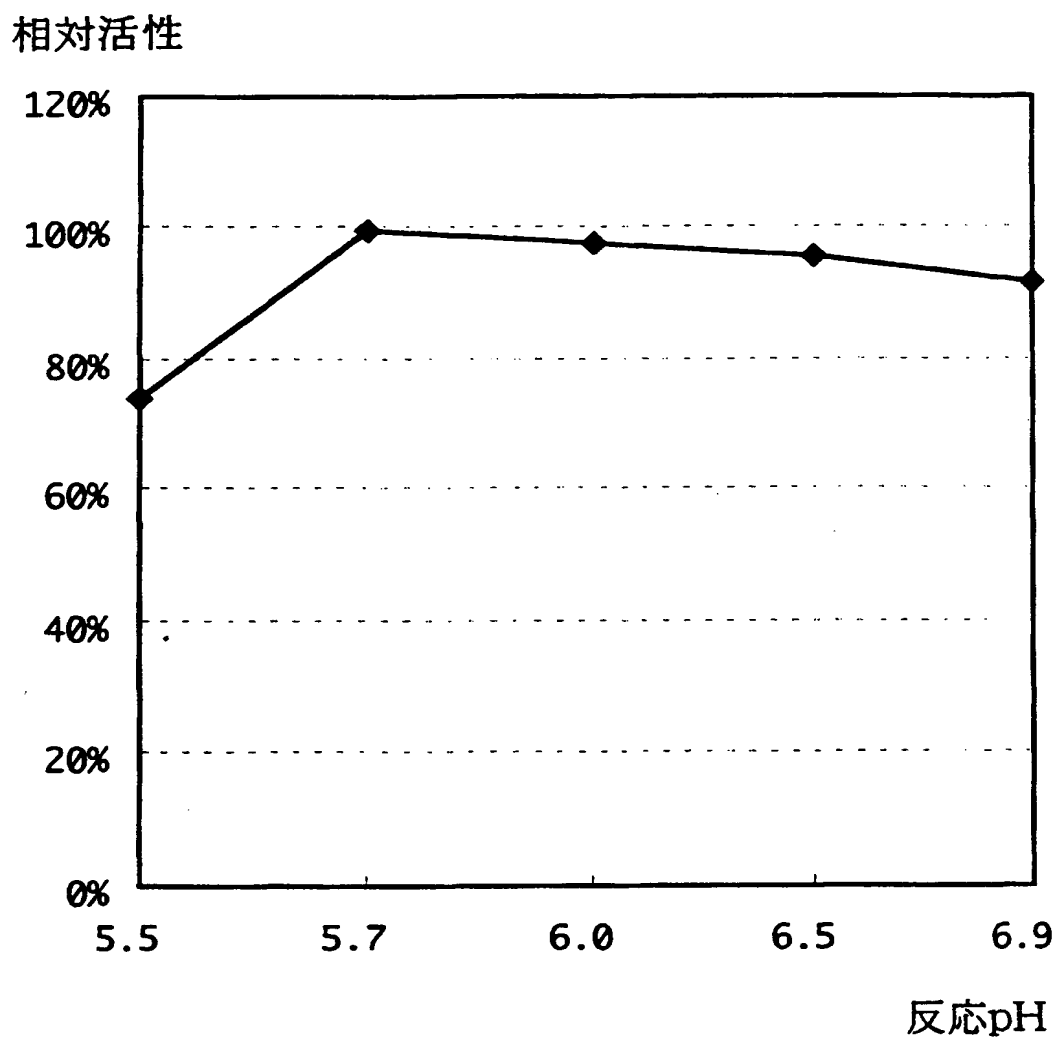
4 / 10

☒ 4



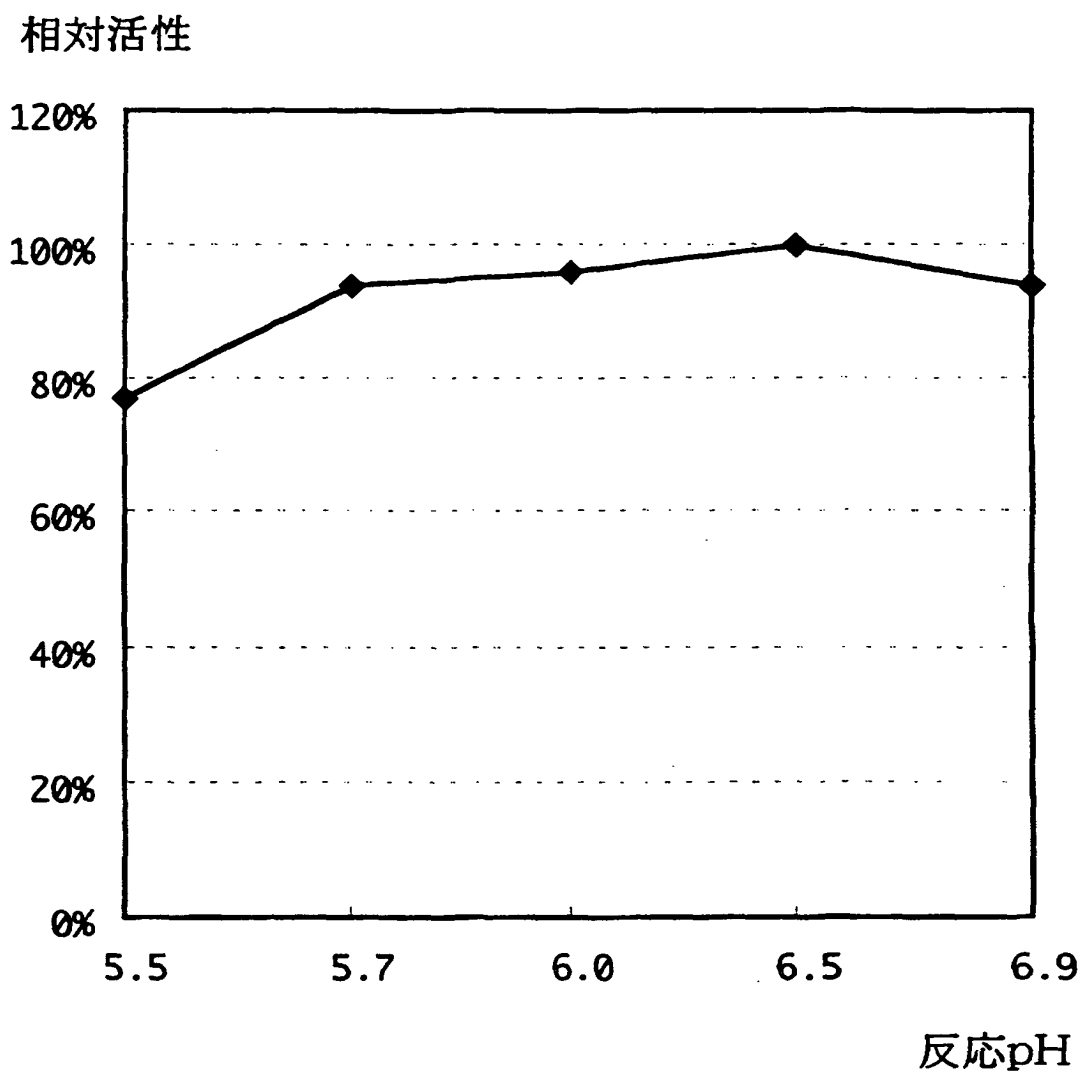
5 / 10

図 5



6 / 10

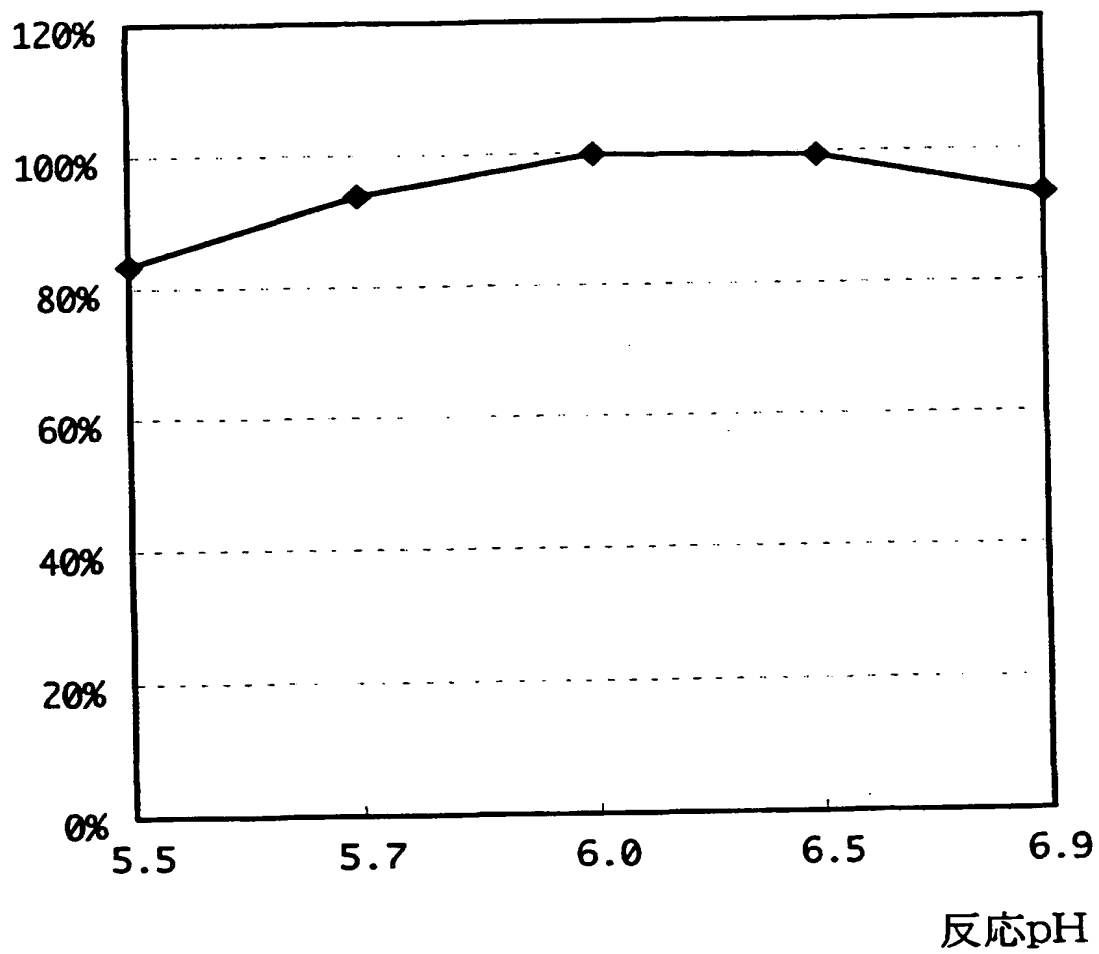
図 6



7 / 10

図 7

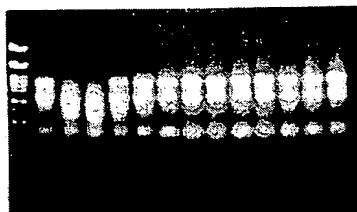
相对活性



8 / 10

☒ 8

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14





9 / 10

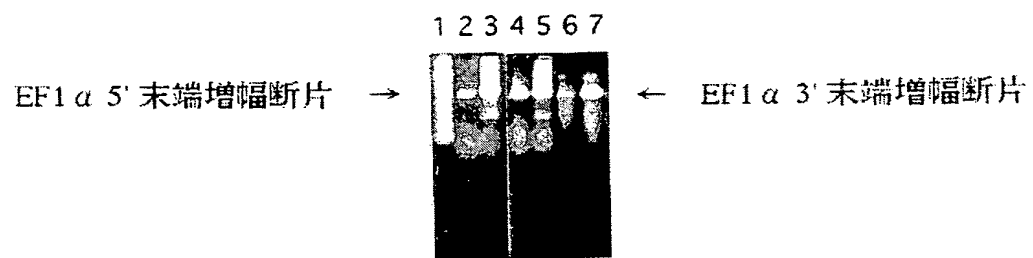
☒ 9

1 2 3 4 5 6



10 / 10

図 10





1/4

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Methods of construction of full length cDNA libraries

<130> H1-102PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-195104

<151> 1999-07-08

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized RNA Sequence



2/4

<400> 1

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

3/4

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

tgctactgtg tcggggttgt a

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

cctgaaccat ccaggccaaa t

21

4/4

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04517

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUZUKI, Y. et al, "Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library", Gene, 1997, Vol.200, p.149-156 (p.150, 2.Materials and methods)	1-7
Y	WO, 94/08001, A1 (KANAGAWA ACAD SCI&TECHNOLOGY), 14 April, 1994 (14.04.94) & EP, 625572, A1 & US, 5597713, A & JP, 6-153953, A	1-7
Y	WO, 98/20122, A1 (INST PHYSICAL & CHEM RES), 14 May, 1998 (14.05.98) & EP, 990702, A1 & JP, 10-127291, A	1-7
Y	LU, X. et al, "Construction and quality of cDNA libraries prepared from cytoplasmic RNA not enriched in poly(A) RNA", Gene, 1988, Vol.71, No.1, p.157-164 (p.164, left column, lines 12-16)	1-7
A	CARNINGI, P. et al, "High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated Cap trapper", DNA Res., 1997, Vol.4, No.1, p.61-66	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 October, 2000 (03.10.00)

Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SUZUKI, Y. et al, "Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library", Gene, 1997, Vol. 200, p. 149-156 (p. 150, 2. Materials and methods)	1-7
Y	WO, 94/08001, A1 (KANAGAWA ACAD. SCI&TECHNOLOGY) 14. 4月. 1994 (14. 04. 94) &EP, 625572, A1 &US, 5597713, A &JP, 6-153953, A	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03. 10. 00

国際調査報告の発送日 10.10.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
六笠 紀子 印
4 B 9 7 3 5
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/20122, A1 (INST PHYSICAL & CHEM RES) 14. 5月. 1998 (14. 05. 98) &EP, 990702, A1 &JP, 10-127291, A	1 - 7
Y	LU, X. et al, "Construction and quality of cDNA libraries prepared from cytoplasmic RNA not enriched in poly(A) RNA ", Gene, 1988, Vol. 71, No. 1, p. 157-164 (p. 164, left column, 12~16 line)	1 - 7
A	CARNINGI, P. et al, "High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated Cap trapper", DNA Res. , 1997, Vol. 4, No. 1, p. 61-66	1 - 7